

報道機関 各位

2021年8月20日

国際連携で挑むタマネギゲノム解読

- 経済的に重要な高等植物種の巨大なゲノムを読み解く -

【発表のポイント】

- 農業分野では、栽培品種の育種目標が多様化する中で、ゲノム配列情報に基づく育種技術の開発が求められている。
- ヒトのゲノムは約30億の塩基対からなっているが、タマネギは、なんとヒトの5倍以上もの約160億塩基対からなっている。祖先種や近縁種を含むタマネギを人類が栽培してきた歴史は数千年以上と非常に長く、現在まで世界中の様々な地域の伝統的な知識や知恵と相まって栄養豊富な健康食材として利用され続けている。しかし、ゲノムサイズの巨大さゆえ、分子生物学手法に基づく大規模な研究はなされておらず、タマネギのもつ魅力的な形質とゲノム情報との関連が未だ不十分である。
- ゲノムのシーケンズ解析では、大量のゲノム配列を細切れにし、お手本となる基準ゲノムと照らし合わせて解読するが多い。一方、基準ゲノムのないタマネギを基準ゲノムを必要としない解析手法である de novo Genome Assembly（参照配列を必要としない配列貼り合わせ）で解読しても、ゲノムの巨大さと複雑さゆえ塩基配列情報の並び順を決定することは難しい。そこで、山口大学、東北大学等からなる国内研究グループは発現遺伝子に関する配列情報を集めることに注力し、異種染色体添加システムを用いて約25,000種類の発現遺伝子の座乗染色体を決定し、さらに倍加半数体システムの特性を活用し、それらの並び方を正確に反映した高密度遺伝子地図情報を整備することに世界で初めて成功した。さらに、この遺伝子地図情報がお手本として一役買い、2021年に日本（山口大学を代表とするグループ）とオランダの共同研究グループがタマネギの全ゲノム解読に世界で初めて成功した。
- 本研究により、タマネギの全ゲノム配列が高精度に明らかになったことで、高等植物におけるゲノム巨大化のメカニズム解明を進めやすくなる。また、整備された配列解析情報に基づく育種技術の開発が期待される。

【社会的背景】

- 国連が提唱する Sustainable Development Goals（SDGs：持続可能な開発目標）中の目標3 [保健]では、「あらゆる年齢のすべての人々の健康的な生活を確保し、福祉を推進する」ことが謳われている。特に我が国では、2030年に人口の約1/3が高齢者になると予測さ

れ、動脈硬化性疾患、血管疾患、神経変性疾患等の加齢関連疾患が増加すると考えられており、発症する前の段階で予防することが重要となる。また、SDGs の能力目標 13[気候変動]の中で「気候変動及びその影響を軽減するための緊急対策を講じる」ことが提唱されている。これらの目標達成に際して農業分野では、疫病蔓延や温暖化が進行する中、ヒトの健康機能性向上や病虫害抵抗性・耐暑性に資するタマネギ品種の育成に活用できるゲノム情報整備が求められている。

- 人類がタマネギを栽培してきた歴史は古く、紀元前 23 世紀のエジプトまで遡ることができ、ピラミッド建設労働者の健康維持に貢献した。この様にタマネギは、各栽培地域における「伝統的な知識」から健康食材と信じられており、このことは今日の医科学分野での基礎研究や広範な臨床研究においても立証されている。本研究では、‘機能性代謝物の宝庫’であるタマネギの化学内容成分群（含硫化合物，フラボノイド類，サポニン類等）の複雑な代謝系を司る遺伝子が染色体上のどこに位置するのかを明らかにした。
- 本研究成果は、ヒトの健康機能性に寄与する新たなタマネギ品種育成に資するゲノム情報の整備につながり、上記の SDGs の達成に貢献できる。

【概要】

山口大学大学院創成科学研究科（農学系学域）の執行正義教授のグループは、東北大学大学院生命科学研究所の佐藤修正教授、かずさ DNA 研究所ゲノム情報解析施設の平川英樹施設長、農研機構の藤戸聡史研究員（野菜花き研究部門）、塚崎光グループ長（東北農業研究センター）、東京農業大学の峯洋子教授、田中啓介助教等との共同研究により、シャロットとタマネギの倍加半数体間の F₂ 分離集団等を用いて次世代シーケンサによる発現遺伝子の網羅的解析を実施した。その結果、約 4,400 個の発現遺伝子を 8 本の染色体に対応した遺伝地図上に整理化させることに成功した。本研究成果は、2021 年 6 月 26 日付で国際科学雑誌 BMC Genomics 電子版に掲載された。本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業、農林水産省戦略的国際共同研究推進事業、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター等のサポートを受けて行われた。さらに、執行教授と佐藤教授はオランダ ワーゲニンゲン大学との共同研究を実施し、上述の発現遺伝子の並び方を全ゲノム配列情報と比較検討し、両者間に高い相関があることを見出した。BMC Genomics に掲載された成果により、オランダの全ゲノム配列情報の確からしさが立証され、世界で初めて高品質なゲノム配列情報を発表するに至った。この研究の成果は、2021 年 7 月 13 日付で米国遺伝学会雑誌 G3: Genes, Genomes, Genetics 電子版に掲載された。これら続けて公開された 2 つの学術論文に記される研究成果は、巨大ゲノムをもつタマネギの植物としての成り立ちを議論する上で重要な基礎的知見を与えるとともに、ゲノム編集等による分子育種研究を進める上で有効な情報資源と成り得る。

【詳細な説明】

先ず、一つ目の研究を紹介する。タマネギやシャロットを含む *Allium cepa* L. のゲノムは 16Gb と非常に大きいため完全解読はなされていない。しかし、我々の次世代シーケンサー (NGS) を使った RNA シーケンシング (RNA-Seq) 解析の結果、発現遺伝子数は他の植物とあまり変わりがなく、多く見積もって 5~6 万個程度と推定されている。そこで、ネギ-シャロット単一異種染色体添加系統 (Monosomic Addition Line; MAL) シリーズならびにシャロット倍加半数体 (Doubled Haploid *A. cepa* Aggregatum group; DHA) とタマネギ倍加半数体 (Double Haploid *A. cepa* common onion group; DHC) 間の F₂ 分離集団を用いて NGS による RNA-Seq 解析を行い、大量に取得した遺伝子配列データから得られた再現性のある一塩基多型 (SNP) に関する各種情報解析を行って各染色体上における 1435 種類の発現遺伝子 (ユニジーン) 配列の並び方を正確に反映させた全長 936.6cM から成る高密度遺伝地図を構築した (図 1)。先ず、8 種類の MAL シリーズからそれぞれ得られたユニジーン配列を、DHA のユニジーン配列に貼り付け、MAL の遺伝子型コールと両親 (ネギ、シャロット) のユニジーンを比較した。その結果、25,462 個のユニジーン配列上に SNP サイトを同定でき、全てのユニジーン配列の座乗染色体情報を 8 種類の *A. cepa* 染色体毎に整理することができた。次に、DHA と DHC の掛け合わせより得られた F₂ 分離集団 (96 個体) を植物材料にして RNA-Seq を行い、ユニジーン配列データを収集した。その結果、5,339 個のユニジーン内に 16,872 個の SNP が同定され、そのうち 1,435 個のユニジーン上から 2 つ以上の同一の遺伝子型をもつ SNP が見出され、信頼性が高いことが示唆された。これらの SNP の遺伝子型情報を用いて連鎖解析を行ったところ、全てのユニジーンを包含した 8 種類の染色体地図が得られ、各染色体地図上のユニジーン配列の順序情報に基づき、さらに 2,963 個のユニジーンを追加し、最終的に約 4,400 個のユニジーンを 8 本の染色体に対応した地図に位置づけ、610 個のジェノタイプブロックを検出することができた (図 2)。この様に我々は日本独自の植物資源を用いて RNA-Seq 解析を行うことにより、多数の染色体特異的ユニジーン配列の SNP 情報に基づいた高密度連鎖地図を効率的に構築することに成功した。これらのユニジーンに関する情報はタマネギの全ゲノム配列解析や有用形質の染色体マーカーの開発を行う上で有用であり、各ユニジーン配列 (染色体マーカー) の情報は、ウェブデータベース「Allium TDB」 (<http://alliumtdb.kazusa.or.jp/>) で公開中である。

次に、二つ目の研究を紹介する。オランダ ワーゲニンゲン大を中心とする研究グループは、タマネギ倍加半数体系統のゲノム配列情報を「*de novo* Genome Assembly (参照配列を必要としない配列貼り合わせ)」と「*ab initio* 遺伝子予測」により解析し、約 16Gb 中の 2.2Gb について既知の 5 種類の連鎖地図中のユニジーン配列情報と対比させ、8 本の各染色体について一本につながった塩基配列 (シュードモレキュール) を作成することができた (図 3)。この際、特に日本側 (山口大、東北大) から提供した先の研究で得られたユニジーン配列の連鎖地図が重要な染色体アンカーマーカー情報となり (図 4)、この度得られた概要配列情報の妥当性検証に有効であった。残りの約 13.8Gb については、89,800 個のスキマフォールドとして一次情報整備を行った。本配列解析の結果、タマネギゲノムの 72.4% が反復配列であることが分かり、その大部分はレトロトランスポゾンで構成されていた。さらに、レトロトランスポゾン配列の約 20% に大量の変異が蓄積しており、それらを個別に同定することは困難だが、Genome Assembly では有

効に活用できる。これらのレトロトランスポゾン、すでにかなり古い時代にゲノム中に取り込まれた可能性が高い。*ab initio* 遺伝子予測法により、540,925 個の推定遺伝子モデルが検出され、この数は予想よりもはるかに多く、ゲノム中に偽遺伝子（発現されない遺伝子）が多数存在していることが示唆された。これらのモデルのうち 86,073 個はアミノ酸配列データベース UNIPROT に登録されているタンパク質配列遺伝子と類似性を有していた。また、遺伝子頻度が高いゲノム領域はみつからず、遺伝子領域はゲノム上に均一に分布していた。先に全配列が公表されたニンニクゲノムとのシンテニー（構造類似性）を解析したところ、共線性が認められたが、両種間で大きな再編成もあった形跡が認められた。今回の Genome Assembly は、今後のタマネギ研究に利用できる高品質なゲノム配列を世界で初めて提供するものであり、完全解読に向けた重要な情報資源と位置づけられる。

【謝 辞】

一つ目の研究は、以下のサポートを受けて実施した。

- ・平成 26～28 年度 日本学術振興会科学研究費 基盤 (B) ネギ属バイオリソースを用いたオミクス統合解析のタマネギ育種への応用 (研究課題番号: 26292020)
- ・平成 29～31 年度 農林水産省戦略的国際共同研究推進事業 (ロシアとの共同公募による共同研究分野) ロシア極東用ネギ属品種育成に向けた分子テクノロジー開発と日露の遺伝資源調査
- ・令和 2～4 年度 農林水産省戦略的国際共同研究推進事業 (ロシアとの共同公募に基づく共同研究分野) ネギ属種におけるオミクスおよび分子細胞遺伝学手法を用いたロシアと日本の遺伝資源開発
- ・平成 26 年度 東京農業大学生物資源ゲノム解析センター 共同利用・共同研究拠点 ネギ類の分子育種と機能性開発を目的とした染色体添加系統の遺伝子発現解析

二つ目の研究は、以下のサポートを受けて実施した。

- ・平成 28 年度 農林水産省国際共同研究推進事業 オランダ遺伝資源センターの植物遺伝資源に係る海外との共同研究に向けた調査研究
- ・平成 29～31 年度 山口大学重点連携大学事業 ワーゲニンゲン大学 (WUR) と山口大学 (YU) の交流推進プロジェクト

【用語説明】

*1 シャロット: 東南アジアでよく栽培されているサイズの小さなタマネギ。暑さに強く、強健だが、国内生産は少ない。タマネギと同じ種に属し、遺伝的に非常に近縁な植物である。

*2 倍加半数体: 半数体の染色体が倍加したもの。すべての遺伝子について完全なホモ接合の状態であるので、次世代での形質の遺伝的分離はみられない純系といえる。通常、生物は両親からそれぞれ一対の染色体のセットを受け継ぐ二倍体として存在し、生物の

組織を形作る体細胞はすべて二対の染色体のセットを有している。一方で、卵子、精子、花粉や卵細胞などの有性生殖のための配偶子は減数分裂を経て一対の染色体のセットのみしか有していない。減数分裂の過程で、両親由来の染色体はそれぞれが対合し部分的に組換えを起こすことから、それぞれの染色体の配列は異なるものとなり、配列の異なる染色体がセットとして構成される配偶子はさらに多様なものとなる。このようにして発生した雌性と雄性的の配偶子が有性生殖を経て受精し発生した個々の個体は遺伝的多様性に富んだものとなる。一対の染色体しか持たない花粉を培養することにより親の染色体数と比べると半分の数の植物体が得られることがあり、これを半数体と呼ぶ。半数体の植物を化学薬品で処理することにより染色体数を倍加し二倍体にもどることが知られているが、化学薬品による処理によらずとも自然に倍加することもある。これらは倍加半数体と呼ばれる。倍加半数体の特徴は、染色体がコピーされて2倍になっているため、対合するそれぞれの染色体の塩基配列が全く同じであるため、対立遺伝子が異なるというヘテロ接合体が存在しない、完全なホモ接合体となる。倍加半数体の植物では、同じ染色体のセットから構成されるため、自殖をしても各個体は同じ遺伝子を有するため、形質の分離が見られない。形質の分離が見られない系統は純系と呼ばれる。

*3 ネギーシャロット単一異種染色体添加系統：単一異種染色体添加系統とは、異種の染色体を1本だけ導入した植物のことをいい、ネギーシャロット単一異種染色体添加系統はネギに8種類のシャロットの染色体を1本ずつ導入した8種類からなる添加系統シリーズである。

*4 F₂分離集団：遺伝的に異なる両親間で交雑が生じ、子の第一世代 (F₁) の個体から自殖によって得られた雑種第二世代を F₂ とよぶ。両親が倍加半数体の場合、F₁ 個体は遺伝的にヘテロ接合となり、その遺伝子型は個体間で全て均質になる。一方で、F₂ では形質の分離が起こり、非常に多様な集団となる。

*5 一塩基多型 (SNP)：ある生物種集団のゲノム塩基配列中に一塩基が変異した多様性がみられ、その変異が集団内で1%以上の頻度で見られる時、これを一塩基多型とよぶ。

*6 ジェノタイプブロック：組み換え最小単位をあらわす SNP マーカーの一群。

*7 スキャフォールド：ゲノム配列の確定作業では、数え切れない DNA 断片の配列を決定し、それらの断片どうしの配列を比較し、それらを連結するという工程が繰り返される。いくつかの断片 (Contig) が連結されたものをスキャフォールド (scaffold) という。これらの scaffold がさらに大きく連結されれば、最終的には、シュードモレキュール (染色体の全体像) がみえてくる。

*8 *ab initio* 遺伝子予測：配列相同性に頼らず、学習データ無しに配列情報だけを用いてゲノム上での遺伝子の位置を予測する方法。

Press Release



*9 レトロトランスポゾン：転移因子の一種で、自分自身の DNA 配列を転写した RNA を逆転写反応によって DNA（コピー）を作成し、ゲノム上の別の場所に挿入することで転移する。

*10 共線性：異なる種において、遺伝子が同じ染色体上に同じ順序で保存されていること。

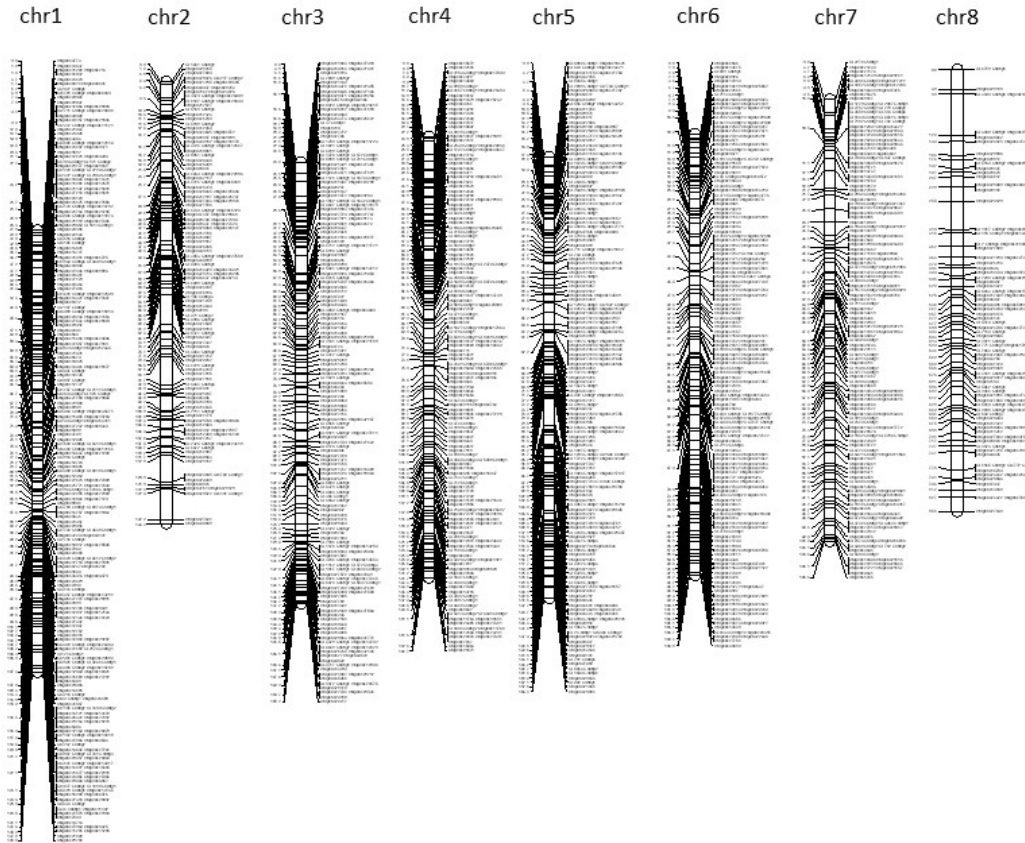


図1 タマネギ高密度遺伝地図

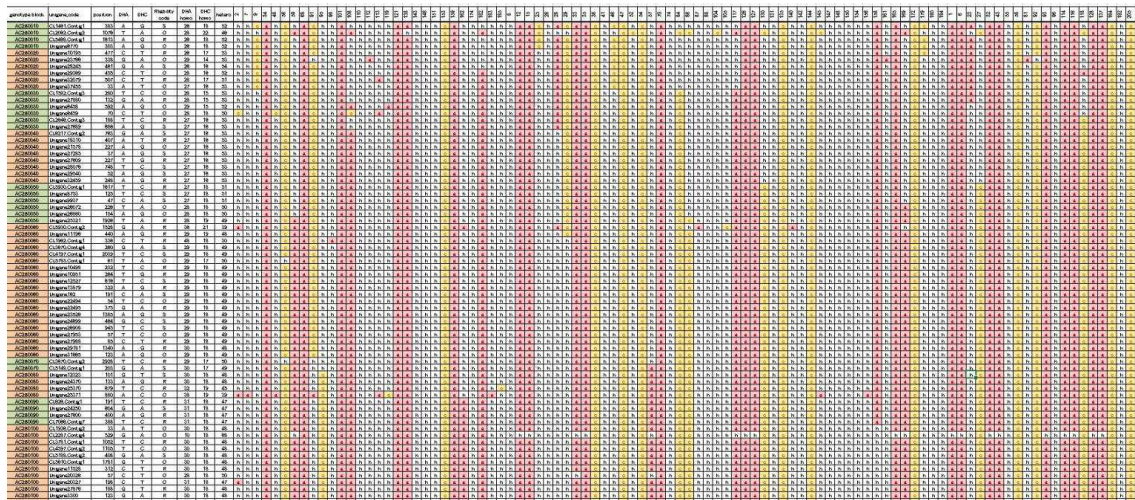


図2 タマネギ第2染色体グラフィカルマップの一部

Press Release

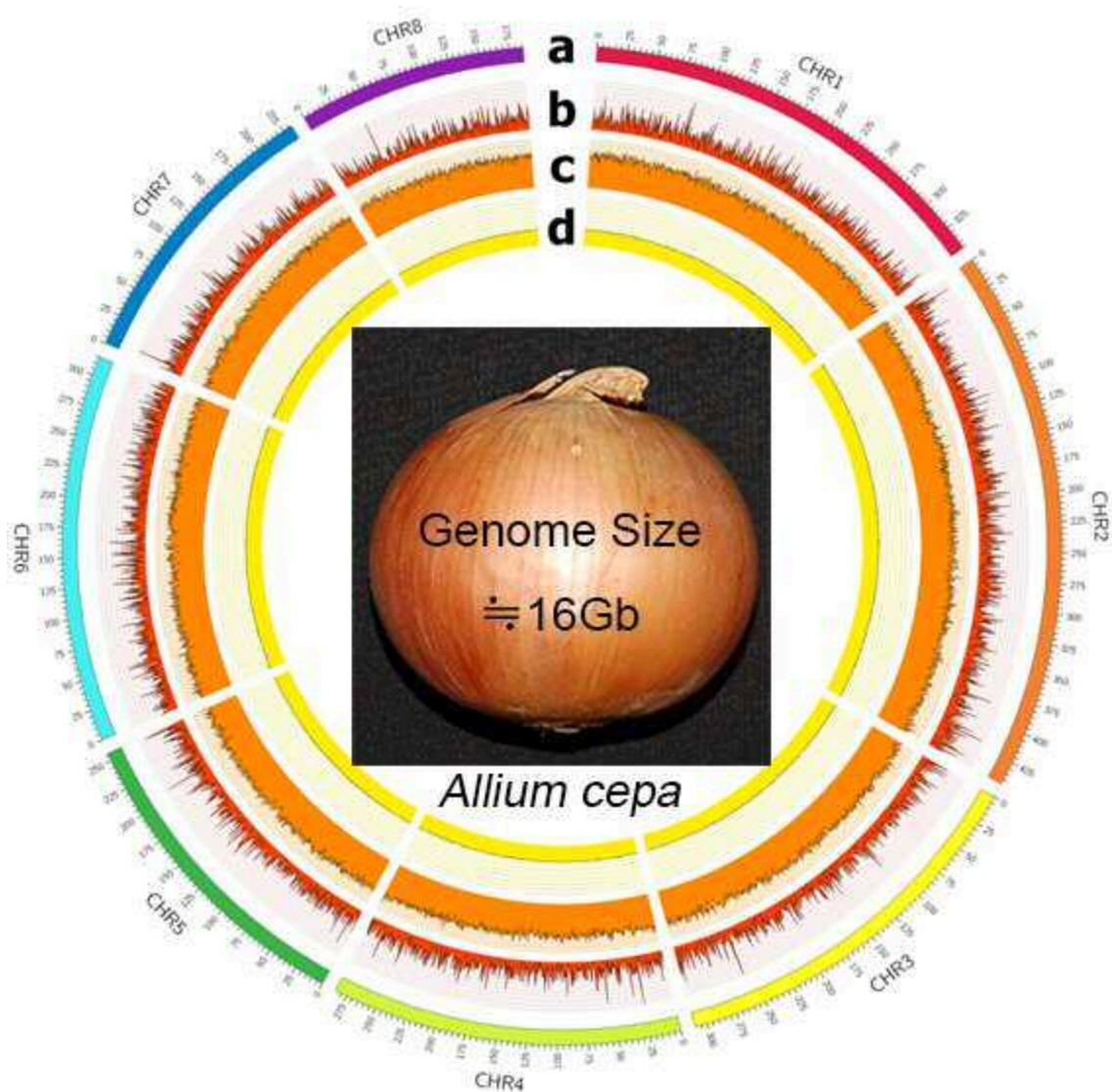


図3 タマネギシュードモレキュール

Press Release

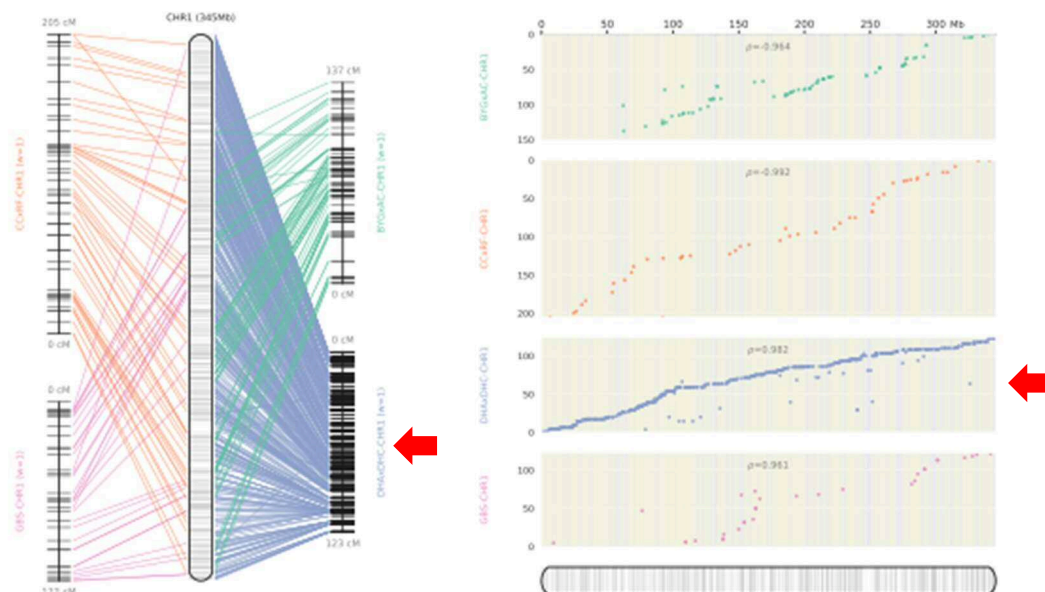


図4 タマネギ第1染色体シュードモレキュール中のコンティグ (DNA 配列断片群) を最終的に並べるために行った遺伝地図配列情報との比較解析
赤の矢印は BMC Genomics で公表した遺伝地図 (右) と双方の並び方がほぼ同じであることが読み取れるグラフ (左) を示す。

【論文題目】

(研究論文1)

題目：Construction of a high-density linkage map and graphical representation of the arrangement of transcriptome-based unigene markers on the chromosomes of onion, *Allium cepa* L.

著者：Satoshi Fujito, Turgut Yigit Akyol, Takuya Mukae, Tadayuki Wako, Ken-ichiro Yamashita, Hikaru Tsukazaki, Hideki Hirakawa, Keisuke Tanaka, Yoko Mine, Shusei Sato, Masayoshi Shigyo

雑誌：BMC Genomics

DOI：<https://doi.org/10.1186/s12864-021-07803-y>

URL：<https://link.springer.com/article/10.1186/s12864-021-07803-y/fulltext.html>

(研究論文2)

題目：Insights from the first genome assembly of onion (*Allium cepa*)

著者：Richard Finkers, Martijn van Kaauwen, Kai Ament, Karin Burger-Meijer, Raymond Egging, Henk Huits, Linda Kodde, Laurens Kroon, Masayoshi Shigyo, Shusei Sato, Ben Vosman, Wilbert van Workum, Olga Scholten

雑誌：G3: GENES, GENOMES, GENETICS

DOI：<https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab243>

URL：<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.05.434149v1.full.pdf>

Press Release



PR@WUR : <https://www.wur.nl/en/Research-Results/Research-Institutes/plant-research/show-wpr/Onion-genome-finally-reveals-its-secrets.htm>